

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-151085

(43) 公開日 平成11年(1999) 6月8日

(51) Int.Cl.⁸

識別記号

F I

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 5/00

B

C 0 7 K 16/40

C 0 7 K 16/40

C 1 2 N 15/02

C 1 2 P 21/08

C 1 2 P 21/08

G 0 1 N 33/573

A

G 0 1 N 33/573

33/577

B

審査請求 未請求 請求項の数 5 F D (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平9-336303

(22) 出願日

平成9年(1997)11月20日

(71) 出願人 000002820

大日精化工業株式会社

東京都中央区日本橋馬喰町1丁目7番6号

(72) 発明者 青木 洋祐

東京都日野市南平四丁目19番2号 多摩南

平パークスクエア 119号

(72) 発明者 鈴木 英明

東京都足立区堀之内一丁目9番4号 大日

精化工業株式会社技術研究センター内

(72) 発明者 高橋 樹由

東京都足立区堀之内一丁目9番4号 大日

精化工業株式会社技術研究センター内

(74) 代理人 弁理士 久保田 耕平

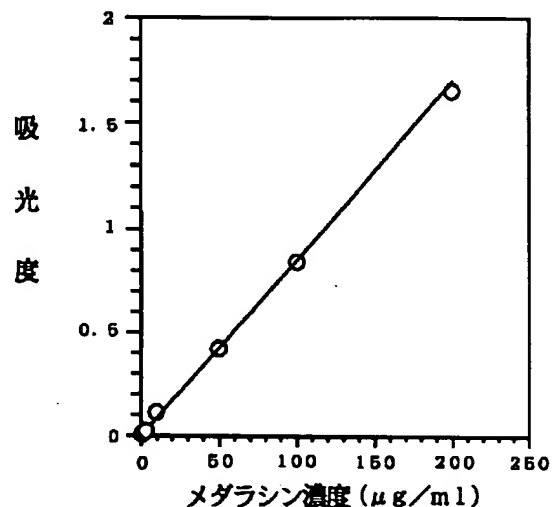
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体、その製造方法及びそれを用いる免疫学的測定方法

(57) 【要約】

【課題】 顆粒球に存在するセリンプロテアーゼの一種であるメダラシンを測定できるモノクローナル抗体及び該抗体を利用したヒトメダラシンの免疫学的測定方法を提供する。

【解決手段】 ヒトメダラシンを特異的に認識する抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体、ヒトメダラシンで免疫した動物から採取した抗体産生細胞と骨髓腫細胞との細胞融合により作製したハイブリドーマを培養し、培養物より抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体を採取することを特徴とする抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体の製造方法及び該抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体を利用するヒトメダラシンの免疫学的測定方法。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトメダラシンを特異的に認識する抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体。

【請求項2】 前記抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体の免疫グロブリンのクラスがIgGである請求項1記載の抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体。

【請求項3】 前記抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体がマウス由来である請求項1記載の抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体。

【請求項4】 ヒトメダラシンで免疫した動物から採取した抗体産生細胞と骨髄腫細胞との細胞融合により作製したハイブリドーマを培養し、その培養物よりヒトメダラシンを特異的に認識する抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体を採取することを特徴とする抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項5】 不溶性担体に固定化した抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体と標識抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体とを用い、試料中のヒトメダラシンと抗原抗体反応によりサンドイッチ錯体を形成させてヒトメダラシンを不溶性担体上に捕捉した後、該錯体中の標識を定量することを特徴とするヒトメダラシンの免疫学的測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術】本発明は、抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体、その製造方法及び該抗体を利用してヒトメダラシンを測定する免疫学的測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】セリンプロテアーゼの一種であるメダラシンは顆粒球等に存在し、炎症、特に慢性炎症の発現を含めて広く生体防御機構において重要な役割を演じていると考えられる。顆粒球メダラシンは多くの慢性炎症性疾患の増悪期で増大し、寛解期で正常化するが、多発性硬化症の患者では増悪する数日前に著増し、寛解に先行して正常化することが認められている。多発性硬化症は、中枢神経系の白質に限局性の脱髄巣とグリオーシスの出現を特徴とし、寛解と悪化を繰り返しながら進行し、多くは、10～15年の経過で死亡すると云う慢性炎症性の難病であり、原因については、未だ、はっきりとは解明されていないが、ウィルスや細菌が免疫系を刺激して抗体が自らの神経組織を攻撃する自己免疫疾患の一種ではないかと考えられている。また、その診断法はなかなか難しく、核磁気共鳴造影法(MRI)等によって行なわれているのが現状であるが、MRI等の方法は非常に大がかりな装置を用い、測定操作も熟練を要し、経費もかかるので、簡便な検査で病気の診断、病勢の把握、予後の推定等が行なえる方法の開発が検討されている。このような方法として、血液中の顆粒球メダラシン活性の測定方法が研究され、アポーオールニチンートラソアミナーゼに対する不活性化能による方法が開発され

ている。しかし、顆粒球メダラシン活性の酵素化学的方法による測定は非常に煩雑であるので、簡便な免疫学的測定方法の開発が試みられ、ポリクローナル抗体を用いる免疫測定方法が行なわれている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、ポリクローナル抗体を用いるヒトメダラシンの免疫測定方法は、抗体の反応性が必ずしも充分ではなく、測定時間が長く、測定操作も若干煩雑であり、迅速、簡便にヒトメダラシンを測定できるモノクローナル抗体を用いる免疫測定方法の開発が望まれていたが、本発明は上記事情に鑑みなされたもので、ヒトメダラシンを特異的に認識するモノクローナル抗体を製造し、これを用いてヒトメダラシンを特異的にかつ迅速、簡便に測定する方法を提供することを課題とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成するために鋭意研究を行なった結果、ヒト顆粒球より分離精製したヒトメダラシンで免疫してから採取した抗体産生細胞と骨髄腫細胞の細胞融合により作製したハイブリドーマを培養するケラーミルシュタインの方法により抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体を製造し、更に、該抗体を利用することによりヒトメダラシンを特異的にかつ迅速、簡便に測定できることを見出し、本発明に到達したものである。

【0005】従って、本発明の第一は、ヒトメダラシンを特異的に認識する抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体に関するものである。

【0006】また、本発明の第二は、ヒトメダラシンで免疫した動物から採取した抗体産生細胞と骨髄腫細胞との細胞融合により作製したハイブリドーマを培養し、その培養物よりヒトメダラシンを特異的に認識する抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体を採取することを特徴とする抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体の製造方法に関するものである。

【0007】更に、本発明の第三は、不溶性担体に固定化した抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体と標識抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体とを用い、試料中のヒトメダラシンと抗原抗体反応によりサンドイッチ錯体を形成させてヒトメダラシンを不溶性担体上に捕捉した後、該錯体中の標識を定量することを特徴とするヒトメダラシンの免疫学的測定方法に関するものである。

【0008】

【発明の実施の形態】本発明の抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体は、健康人血液から分離した顆粒球より抽出したヒトメダラシンで免疫した動物から採取した抗体産生細胞と骨髄腫細胞の細胞融合によって作製したハイブリドーマを培地上で培養するか、又は、動物腹腔内に投与して腹水中で増殖させた後、該培養物又は腹水から採取することにより製造される。

【0009】本発明の抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、いわゆる細胞融合によって製造される。即ち、抗原としてヒトメダラシンを用いて免疫した動物から抗体産生細胞を調製し、これを骨髓腫細胞と融合させ、得られたハイブリドーマを選択的に増殖させ、該ハイブリドーマから抗体産生ハイブリドーマを検索し、クローニングにより目的とするモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを得る。

【0010】抗体産生細胞としては、例えばヒトメダラシン又はこれを含有する組成物もしくは細胞を投与して免疫した動物から得られる脾臓細胞、リンパ節細胞、B-リンパ球等が挙げられる。免疫する動物としてはマウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウマ等が挙げられる。免疫は、例えばヒトメダラシンをそのまま又は適当なアジュバントと共に動物の皮下、筋肉内或いは腹腔内に約1 μ g~1mg/回を1~2回/月、1~6ヶ月間投与することにより行なわれる。抗体産生細胞の分離は、最終免疫から2~4日後に免疫動物から採取することにより行なわれる。

【0011】骨髓腫細胞としては、マウス、ラット由来のもの等が使用できる。抗体産生細胞と骨髓腫細胞とは同種動物由来であることが好ましい。

【0012】細胞融合の方法は任意であるが、例えばダルコッペ改変イーグル培地(DMEM)等の培地中で抗体産生細胞と骨髓腫細胞とポリエチレングリコール等の融合促進剤の存在で混合することにより行なうことができる。

【0013】細胞融合終了後、DMEM等で適当に希釈し、遠心分離し、沈殿をHAT培地等の選択培地に懸濁して培養することによりハイブリドーマを選択する。次いで、培養上清を用いて酵素抗体法により抗体産生ハイブリドーマを検索し、限界希釈法等によりクローニングを行ない、本発明の抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得る。

【0014】斯くして得られた抗体産生ハイブリドーマを利用して本発明のモノクローナル抗体を製造するには、該ハイブリドーマを適当な培地中又は生体内で培養し、該培養物からモノクローナル抗体を採取することによって行なわれる。就中、モノクローナル抗体を大量に製造するには、該ハイブリドーマを骨髓腫細胞の由来細胞と同種の動物の腹腔内に投与し、その腹水中に本発明のモノクローナル抗体を蓄積させ、該腹水から採取する方法が好ましい。抗体産生ハイブリドーマの腹腔内投与に先だって動物にプリスタン等の鉱物油を投与するのが好ましい。

【0015】培養物または腹水からの本発明のモノクローナル抗体の分離は、IgG精製に通常使用される硫酸分画法、陰イオン交換体もしくはプロテインA、G等のカラムによるクロマトグラフィーによって行なうことができる。

【0016】斯くして得られた本発明の抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体は、これを産生するハイブリドーマの種類により3F03、3G03、2E04、及び1G12の4種類存在する。これらのモノクローナル抗体は、いずれもグロブリンクラスはIgGで、サブクラスはIgG₁であり、いずれの抗体も抗原であるヒトメダラシンと特異的に反応する。

【0017】従って、本発明の抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体を利用することによりヒトメダラシンを免疫学的に測定することができる。本発明のモノクローナル抗体を利用してヒトメダラシンを測定する方法は任意であるが、不溶性担体に固定化した該モノクローナル抗体に標識化抗原の存在で試料中の抗原を反応させる競合法、又は不溶性担体に固定化した該モノクローナル抗体に試料中の抗原を反応させて捕捉した後標識化した該モノクローナル抗体を反応させて抗体-抗原-抗体からなるサンドイッチ錯体を形成させるサンドイッチ法等が好適に用いられる。このサンドイッチ法による酵素免疫測定方法においては、サンドイッチ錯体を形成させるためには不溶性担体に固定化した固定化抗体と標識化抗体とは抗原に対する反応部位が異なることが必要であり、従って、一般的にはエピトープの異なるモノクローナル抗体の組み合わせを用いて測定系を構成するが、本発明のモノクローナル抗体2E04においては同一のモノクローナル抗体を固定化抗体及び標識抗体に用いてもヒトメダラシンの免疫学的測定系を構成することが可能であった。これはヒトメダラシンが分子内に同一アミノ酸配列を有するエピトープを有するためである。これらの測定方法に使用される不溶性担体としては、ポリスチレン等のプラスチック製ビーズ、又はマイクロプレート等が挙げられる。標識化抗体の標識物質としては、酵素、蛍光物質、発光物質及び放射性物質等を使用するのが有利である。酵素としては、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ等、蛍光物質としては、フルオレッセインイソシアネート、フィコビリプロテイン等、発光物質としては、ルミノール類、ジオキセタン類、アクリジニウム塩類等、放射性物質としては¹²⁵I、¹³¹I、¹¹¹In、^{99m}Tc等を非限定的に挙げるができる。標識物質が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、必要により発色剤、蛍光剤、及び発光剤等が用いられる。酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、基質として過酸化水素等を用い、発色剤として2, 2'-アジノジ[3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸]アンモニウム塩(ABTS)、5-アミノサリチル酸、o-フェニレンジアミン、4-アミノアンチピリン、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン等、蛍光剤としては4-ヒドロキシフェニル酢酸、3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸等、発光剤としてはルミノール類等、酵素としてアルカリホスファターゼを用いる場合には、基質とし

て4-ニトロフェニルホスフェート、4-メチルウムベリフェリルホスフェート、コルチゾール-21-ホスフェート等、酵素として β -D-ガラクトシダーゼを用いる場合には、2-ニトロフェニル- β -D-ガラクトシド、4-メチルウムベリフェリル- β -D-ガラクトシド、3-(2'-スビロアダマンタン)-4-メトキシ-4(3''- β -D-ガラクトシルオキシフェニル)-1,2-ジオキセタン(AMPGD)等を用いることができる。

【0018】

【実施例】以下、参考例と共に実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例等に限定されるものではない。尚、実施例中の%は重量%を意味する。

【0019】[参考例1] 健常人血液400mlに、デキストラン(分子量200,000~300,000)の6%生理食塩水溶液を血液:デキストラン水溶液=2:1の割合で混合し、ガラス棒等で軽くかき混ぜてから、4~8℃の温度で約1時間静置した後、沈殿した赤血球を上清と分離し、この上清を15,000rpmで遠心分離して沈殿を採取して白血球を得た。次に、この白血球に1mMエチレンジアミン4酢酸2ナトリウム塩(EDTA)、1mMp-クロロマーキュリー安息香酸(PCMB)を含むpH7.0の1Mリン酸カリウム緩衝液(PKB)からなる抽出用液を加えて、攪拌下に37℃の温度で20分間インキュベートした後、15秒間超音波破碎機にかけて完全に細胞を破碎し、更に、37℃の温度で20分間インキュベートしてから、4℃の温度において12,000rpmで10分間遠心分離して上清を採取し、この上清を蒸留水に対して透析し、沈渣は上記と同様の操作を数回繰り返して抽出を行なった。次いで、この抽出液を50mMPKB(pH6.0)で平衡化したCM-セファロースゲルカラムに通した後、同じ緩衝液で洗浄してから、1MPKB(pH6.0)で吸着物を溶出し、溶出液を蒸留水に対して一晩透析して脱塩してから、コロジオン膜で濃縮することにより、精製ヒトメダラシン1.5mgが得られた。

【0020】[実施例1]

抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体の製造

(1) 抗体産生細胞とミエローマ細胞の細胞融合によるハイブリドーマの作製

参考例1でヒト顆粒球から抽出、精製したヒトメダラシンを、フロイント完全アジュバントで乳化し、7週齢のBALB/cマウスの皮下に50 μ g/匹の量で投与した。そして、4週間後にこのマウスに初回と同様の方法で追加免疫を行ない、7日後に血中に抗体量が増大したことを確認した後、更に、その7日後に最終免疫として抗原を腹腔に50 μ g/匹の量で投与した。一方、20%の牛胎児血清を添加したDMEM中で、マウスミエローマ細胞P3-X63-Ag8-U1(P3U1)を継代培養しておき、最終免疫の3日後、このマウスから脾

臓細胞を採取して、これをポリエチレングリコール4000を用いてP3U1と細胞融合させた。細胞融合後、培地を100 μ Mヒポキサンチン、0.4 μ Mアミノプテリン、16 μ Mチミジンを添加したDMEM(HAT培地)に置換して96穴マイクロプレートに撒き、2~3週間選択培養することにより脾臓細胞とミエローマ細胞との融合体であるハイブリドーマが得られた。

【0021】(2) 抗ヒトメダラシン抗体産生性ハイブリドーマのスクリーニング

10 次に、このハイブリドーマの培養液中の抗体活性を、ELISA(Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)でスクリーニングした。即ち、ヒトメダラシンをELISA用のマイクロプレートに吸着させ、pH7.4の10mMリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に1%の牛血清アルブミン(BSA)を添加した溶液でブロッキング処理を行なった後、ハイブリドーマ培養液50 μ lをこのマイクロプレートに添加して1時間放置してから、ハイブリドーマ培養液を除去して洗浄し、これにペルオキシダーゼ標識山羊抗マウスIgG-Fc特異抗体の2 μ g/ml PBS溶液100 μ lを添加し、37℃で1時間反応させた。次いで、この酵素標識抗体溶液を除去し洗浄した後、0.05%ABTS及び0.0034%過酸化水素を含む0.1Mリン酸クエン酸緩衝液(pH4.6)を200 μ l添加して発色させることにより抗ヒトメダラシン抗体産生性ハイブリドーマを選別した。

【0022】(3) 抗体産生株のクローニング及びモノクローナル抗体の作製

この抗ヒトメダラシン抗体産生性ハイブリドーマ培養液を採取し、限界希釈法によるクローニングを行なって最終的に単クローンのハイブリドーマ4種類を得た。このハイブリドーマを、夫々、プリスタン投与BALB/cマウスの腹腔に投与して増殖させ、モノクローナル抗体を含む腹水を得た。次いで、得られた腹水に50%飽和硫酸を加えて抗体を沈殿させ、この沈殿を分離してPBSに溶解させ、3M NaCl含有50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.8)に対して透析してから、プロテインA-セファロースCL4Bカラム(ファルマシア社製)にかけた後、吸着した抗体を0.1Mグリシン塩酸緩衝液(pH6.0)で溶出し中和して精製することにより3F03、3G03、2E04、及び1G12からなる4種類のモノクローナル抗体を得た。

【0023】(4) モノクローナル抗体の性質

【ウェスタンブロッティング法】モノクローナル抗体に特異的な抗原をウェスタンブロッティング(Western blotting)法を用いて固定した。先ず、ヒト顆粒球由来メダラシンをLaemmliの方法によるSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた後、電解液バッファーに25mMトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、192mMグリシン及び20%メタノールを含む溶液を用い、電圧傾斜が7V/cm、2時間の条件でスラブゲル

から蛋白をニトロセルロースシートへ移した。次に、ニトロセルロースシートの各レーンを切り離し、一方のシートをアミドブラックで蛋白染色し、他方は次の様な酵素免疫アッセイを行なった。即ち、1%BSA/PBSでブロッキング処理した後、1次抗体としてマウス抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体を加え、2次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識山羊抗マウスIgG-Fc特異抗体を加えて反応させ、洗浄してから、5-ブ

ロモ-4-クロロ-3-インドリルフォスフェイト (0.7×10^3 M) / ニトロブルーテトラゾリウム塩 (0.7×10^3 M) を含む0.1Mトリス塩酸緩衝液 (pH9.5) からなる基質溶液を加えて発色させることにより、4種のマウス抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体は、ヒト顆粒球由来メダラシンを認識することが確認された。

【0024】[インヒビション・アッセイ法] ELISA用マイクロプレートに固定したヒトメダラシンに対して、ビオチン化した第一の抗体と非標識の第二の抗体を共存させて反応させた後、アビジン化ペルオキシダーゼを反応させ、次いで、このペルオキシダーゼを基質溶液の添加により発色させてビオチン化抗体の反応量を測定するインヒビション・アッセイ (Inhibition assay) 法により、いずれの2つの組み合わせにおいてもビオチン化抗体の反応量に変化がないことより、4種のモノクローナル抗体はいずれも互いに異なるエпитープ (抗原部位) を認識することが確認された。

【0025】[実施例2]

ヒトメダラシンの免疫学的測定方法I

(1) モノクローナル抗体固定化ビーズの調製

ポリスチレン製ビーズ (直径6mm) をよく洗浄してから、マウス抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体 (2E04) $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含むPBS (pH7.4) 溶液中に4℃の温度で1昼夜放置した後、PBSで洗浄し、1%BSA水溶液に4℃の温度で1昼夜放置してブロッキング処理を施すことによりモノクローナル抗体固定化ビーズが得られた。

【0026】(2) ペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体の調製

マウス抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体 (2E04) $1.0 \text{mg}/\text{ml}$ を含むPBS溶液に、N-(m-マレイミド安息香酸)-N'-サクシンイミドエステル (MBS) の $10 \text{mg}/\text{ml}$ の濃度のジメチルホルムアミド溶液0.1mlを添加し、25℃の温度で30分間反応させる。次いで、この反応混合液をセファデックスG-25を充填したカラムを用い、0.1Mリン酸緩衝液 (pH6.0) でゲル濾過を行ない、マレイミド化モノクローナル抗体と未反応MBSとを分離した。

【0027】一方、ペルオキシダーゼ酵素としてホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ (HRP) の $1.0 \text{mg}/\text{ml}$ のPBS溶液に、N'-サクシンイミジル-3-

(2-ビリジルチオ) プロピオネート (SPDP) の $10 \text{mg}/\text{ml}$ の濃度のエタノール溶液を添加し、25℃の温度で30分間反応させる。次いで、この反応混合液をセファデックスG-25を充填したカラムを用い、0.1M酢酸緩衝液 (pH4.5) でゲル濾過して精製、ビリジルジスルフィド化HRPを含有する画分を採取し、これをコロジオンバック中において氷冷下に約10倍に濃縮する。次に、これに0.1Mジチオスレイトールを含有する0.1M酢酸緩衝生理食塩水 (pH4.5) 1ml を添加して、25℃の温度で30分間攪拌してHRP分子中に導入したビリジルジスルフィド基を還元した後、この反応混合液をセファデックスG-25を充填したカラムを用いてゲル濾過し、チオール化HRPを含有する画分が得られた。

【0028】次に、マレイミド化モノクローナル抗体とチオール化HRPとを混合し、コロジオンバックを用いて氷冷下に $4 \text{mg}/\text{ml}$ の蛋白質濃度まで濃縮し、4℃で一昼夜放置した後、ウルトロゲルAcA44 (SEPRACOR社) を充填したカラムを用いてゲル濾過し、ペルオキシダーゼ酵素標識モノクローナル抗体が得られた。

【0029】(3) ヒトメダラシンのサンドイッチ酵素免疫測定方法

マウス抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体 (2E04) を固定化したビーズ各1個と、精製したヒトメダラシン (標準物質) 0, 1, 10, 100, 200 ng/ml の濃度で含有する2%BSA含有PBS溶液 $50 \mu\text{l}$ とHRP標識マウス抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体 (2E04) $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で含有する2%BSA含有PBS溶液 $350 \mu\text{l}$ を試験管に充填して37℃の温度で30分間インキュベートした。次に、試験管内の溶液を吸引除去した後、生理食塩水で洗浄してから、0.05%ABTS及び0.0034%過酸化水素を含む0.1Mリン酸クエン酸緩衝液 (pH4.6) を $400 \mu\text{l}$ ずつ各試験管内に加え、37℃の温度で30分間インキュベートした後、反応停止剤として0.1Nシュウ酸水溶液を 1ml ずつ加えて酵素反応を停止させた。次いで、この溶液を分光光度計を用いて420nmの波長の吸光度を測定し、これを標準物質濃度に対してプロットすることにより、同一のモノクローナル抗体を固定化抗体及び酵素標識抗体として用い、図1に示されるような濃度依存性の良い検量線が得られた。

【0030】[実施例3]

ヒトメダラシンの免疫学的測定方法II

(1) モノクローナル抗体固定化ビーズの調製

ポリスチレン製ビーズ (直径6mm) をよく洗浄してから、マウス抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体 (3F03) $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含むPBS (pH7.4) 溶液に4℃の温度で1昼夜放置した後、PBSで洗浄し、1%BSA水溶液に4℃の温度で1昼夜放置してブロッキング処理を施すことによりモノクローナル抗体固定化ビ

ーズが得られた。

【0031】(2) ヒトメダラシンのサンドイッチ酵素免疫測定方法

マウス抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体(3F03)を固定化したビーズ各1個と、精製したヒトメダラシン(標準物質)0.1, 10, 100, 200 ng/mlの濃度で含有する2%BSA含有PBS溶液50μlとHRP標識マウス抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体(2E04)0.2μg/mlの濃度で含有する2%BSA含有PBS溶液350μlを試験管に充填して37℃の温度で30分間インキュベートした。次に、試験管内の溶液を吸引除去した後、生理食塩水で洗浄してから、0.05%ABTS、及び0.0034%過酸化水素を含む0.1Mリン酸クエン酸緩衝液(pH4.6)を400μlずつ各試験管内に加え、37℃の温度で30分間インキュベートした後、反応停止剤として0.1Nシュウ酸水溶液を1mlずつ加えて酵素反応を停止させた。次いで、この溶液を分光光度計を用いて420nmの波長の吸光度を測定し、これを標準物質濃度に対してプロットすることにより、図2に示されるような濃度依存性の良い検量線が得られた。

【0032】[実施例4]

酵素免疫測定方法による臨床検体中のメダラシンの測定
健康人及び多発性硬化症患者血液を採取して凍結保存した試料を室温に戻して融解させ、その10μlを採取しPBS(pH7.4)2ml中に加えて均一に混合して検体溶液とした後、その10μlを試験管に添加し、これに2.5%BSA含有PBS(pH7.4)40μlを加えて希釈し、次いで、この試験管にマウス抗ヒトメダラシ

ンモノクローナル抗体(2E04)もしくは(3F03)を固定化したビーズ各1個とHRP標識マウス抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体(2E04)0.2μg/mlの濃度で含有する2%BSA含有PBS溶液350μlを試験管に充填して37℃の温度で30分間インキュベートした。次に、前述の検量線を作成する場合と全く同じ操作により、洗浄、酵素反応及び反応停止を行なった後、分光光度計を用いて420nmの波長の吸光度を測定し、検量線よりヒトメダラシン濃度を求めた。その結果、検体血液中のヒトメダラシン濃度は、測定法I及びIIにより健康人が夫々10.0μg/ml及び9.6μg/mlであり、多発性硬化患者が夫々37.3μg/ml及び35.8μg/mlであった。

【0033】

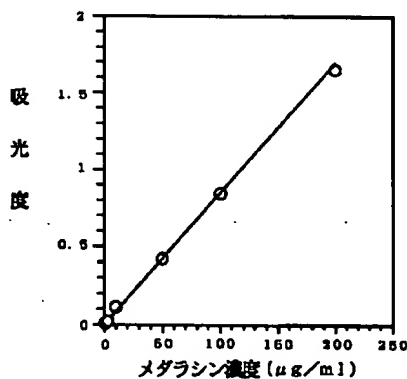
【発明の効果】顆粒球に存在するセリンプロテアーゼの一種であるメダラシンを特異的に認識する抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体を製造することにより、ヒトメダラシンの免疫学的測定を迅速、簡便に行なうことが可能となり、更に、慢性炎症性疾患、特に多発性硬化症の血液診断等に利用することができる。

【図面の簡単な説明】

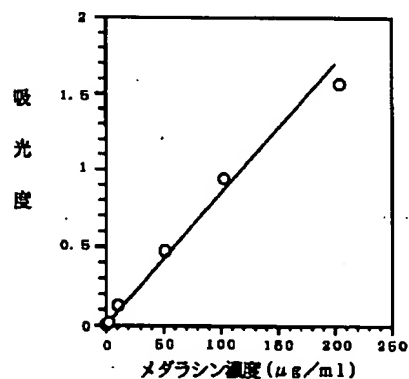
【図1】実施例2記載の酵素免疫測定方法(測定法I)を用いてヒトメダラシン(標準物質)を測定し、その吸光度を抗原濃度の関数としてプロットして作成したヒトメダラシン測定用の検量線である。

【図2】実施例3記載の酵素免疫測定方法(測定法II)を用いてヒトメダラシン(標準物質)を測定し、その吸光度を抗原濃度の関数としてプロットして作成したヒトメダラシン測定用の検量線である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

F I

G 0 1 N 33/577

C 1 2 N 15/00

C

//(C 1 2 P 21/08

(7)

特開平11-151085

C12R 1:91)

(72)発明者 葛城 寿史

東京都足立区堀之内一丁目9番4号 大日
精化工業株式会社技術研究センター内